



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

00123710.6

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

08/10/01



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:
Application no.: 00123710.6
Demande n°:

Anmeldetag:
Date of filing: 31/10/00
Date de dépôt:

Anmelder:
Applicant(s):
Demandeur(s):
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel
SWITZERLAND

Bezeichnung der Erfindung:
Title of the invention:
Titre de l'invention:
Optimierung von Fermentationen

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:
State:
Pays:

Tag:
Date:
Date:

Aktenzeichen:
File no.
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:
International Patent classification:
Classification internationale des brevets:
/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE/TR
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:
Remarks:
Remarques:

F. Hoffmann-La Roche AG, CH-4070 Basel, Schweiz

Case 20780

Optimierung von Fermentationen

Bei Fermentationen, d.h. Umwandlung von Stoffen unter Einsatz von Mikroorganismen (im folgenden kurz Bioprozesse genannt) werden als Nährstoffquelle für den Mikroorganismus häufig zusätzlich komplexe Nährstoffe verwendet. Komplexe Nährstoffe sind Rohstoffe, die zwei oder mehrere für das Wachstum von Mikroorganismen erforderliche oder das Wachstum von Mikroorganismen unterstützende Substanzen enthalten. Beispiele sind hauptsächlich natürliche Rohstoffe, wie Maisquellwasser (Cornsteep-Pulver bzw. -Liquor, ein Abfallprodukt bei der Stärkeextraktion aus Mais) oder Hefeextrakt, aber auch synthetische Mischungen aus Einzelsubstanzen. Ein besonderer Vorteil dieser komplexen Nährstoffe ist die große Bandbreite an Einzelsubstanzen, wie Aminosäuren, Proteinen, Vitaminen, Mineralsalzen und Spurenelementen, die den Mikroorganismen zur Verfügung gestellt werden kann. Dies ist für das Erzielen hoher Wachstumsraten gegenüber der Verwendung minimaler, chemisch definierter Medien ein Vorteil.

Bezüglich der Verwendung komplexer natürlicher Nährstoffe bei Bioprozessen bestehen jedoch verschiedene Problemfelder. Da es sich in der Regel um Naturprodukte handelt, ist die Qualität komplexer Nährstoffe in Abhängigkeit von Hersteller und Charge starken Schwankungen unterlegen. Ausserdem ist die naturgegebene Zusammensetzung komplexer Nährstoffe bezüglich des tatsächlichen Bedarfs der Mikroorganismen nicht notwendigerweise optimal. Bestimmte Inhaltsstoffe sind in der Regel in zu geringer Menge vorhanden und wirken daher limitierend, andere Inhaltsstoffe hingegen liegen im Überschuss vor und werden dadurch nur verschwendet oder wirken sogar inhibierend. Der

- 2 -

gesamte Metabolismus der vielen verschiedenen Inhaltsstoffe komplexer Nährstoffe ist seinerseits wiederum äußerst komplex und zum Teil unbekannt. Außerdem können verschiedene sich überlagernde Adaptierungsvorgänge unter Umständen starke Prozeßschwankungen hervorrufen. Die Folge können Inkonsistenzen bezüglich der Produktivität und der Ausbeute des Bioprozesses sein. Besonders bei mehrstufigen Produktionsprozessen kann dies sehr problematisch sein, da folgende Prozeßstufen in Mitleidenschaft gezogen werden können. Außerdem führen nicht optimale Betriebszustände zu höheren Betriebskosten. Die einmalige Optimierung des Mediums in Hinblick auf nur wenige Schlüsselsubstanzen kann nicht als ausreichend betrachtet werden, da nicht nur die Eigenschaften der komplexen Nährstoffe variabel sind, sondern auch das System selbst, repräsentiert durch die metabolisierenden Mikroorganismen.

Bekannte Optimierungsstrategien sind die voll faktorielle Versuchsplanung, sich um ein statistischer Ansatz, bei dem alle möglichen Kombinationen unabhängiger Variablen bei geeigneten Zuständen untersucht werden. Ein Modell des Systems ist daher erforderlich. Obwohl bei wenigen zu untersuchenden Substanzen und Konzentrationen schneller ein Optimum erreicht wird, sind diese Verfahren bei einer höheren Zahl von Variablen und Zuständen jedoch wegen der gewaltigen Menge erforderlicher Experimente praktisch kaum durchführbar. Eine effizientere Optimierungsstrategie ist die teilfaktorielle Versuchsplanung mit 'Response Surface' Methodik, wie z.B. die Plackett-Burman Methode (Greasham, R. L. und Inamine, E.: Nutritional improvement of processes. In: Demain, A. L. und Solomon, N. A. (Hrsg.), Manual for industrial microbiology and biotechnology. Washington: ASM 1986, S. 41-48) oder die Box-Behnken Methode (Greasham, R. L. und Herber, W. K.: Design and optimization of growth in media. In: Rhodes, P. M. and Stanbury (Hrsg.), Applied microbial physiology – a practical approach. Oxford: Oxford University Press 1997, S. 53-74). Die Zahl der Variablen wird dabei auf solche mit signifikantem Effekt auf z. B. das Wachstum oder die Produktbildung reduziert.

Genetische Algorithmen sind im Gegensatz zu den statistischen Methoden nicht modellbasierte Optimierungsverfahren. Für deren Anwendung bedeutet das, daß sich generell nicht auf theoretische Überlegungen bezüglich des Stoffwechsels der Mikroorganismen gestützt werden muß. Mit diesen Verfahren kann eine große Zahl von Medienkomponenten in konvergierender Weise optimiert werden. Aus einer Reihe paralleler Schüttelkolben-Experimente werden die besten ausgewählt, deren Medien die Ausgangspunkte der nächsten Generation von Experimenten ist. Diese Prozedur wird solange wiederholt, bis Konvergenz erreicht ist. In der ersten Generation werden die Medien per Zufall variiert (Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, M. und Wandrey, C.: Substrate Controlled Fed-Batch Production of L-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Prog. 13 (1997), S. 387-393). Weuster-Botz et al. (Integrated development of

- 3 -

fermentation and downstream processing for L-isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46 (1996), S. 209-219) konnten mit 180 Schüttelkolben-Experimenten 8 Spurenelemente mit einem genetischen Algorithmus optimieren, wodurch die L-Isoleucin Konzentration um 50% gegenüber dem Standardmedium verbessert werden konnte. Mit dem gleichen Verfahren optimierten Weuster-Botz et al. Error! Reference source not found. für einen L-Lysine Prozeß 13 Mediumkomponenten mit 472 standardisierten Schüttelkolben-Experimenten. Die L-Lysine Konzentration konnte dadurch um über 200% verbessert werden. Verglichen mit statistischen Ansätzen einschließlich der 'Response Surface' Methodik mit einem gewöhnlichen vollständigen Polynom-Modell zweiter Ordnung konnte die Zahl der Experimente deutlich reduziert werden: 472 anstelle von $2^{13} = 8192$; alle möglichen Kombinationen der Parameter hätten 101^{13} Experimente bedeutet. Es gibt jedoch auch bedeutende Nachteile der Durchführung von Medienoptimierungen mit absatzweisen Schüttelkolben-Experimenten: In der Regel ist es nicht möglich, den pH-Wert auf einem konstanten Wert zu halten. Der Sauerstoffeintrag ist aufgrund der Oberflächenbegasung nur sehr mäßig. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit durch veränderliche Starterkulturen nicht immer gegeben.

Die Puls-Methode in chemostatischer Kultur (Kuhn, H., Friederich, U. und Fiechter, A.: Defined minimal medium for a thermophilic *Bacillus* sp. developed by a chemostat pulse and shift technique. Eur. J. Appl. Microbiol. 6 (1979), S. 341-349; Goldberg, I. und Er-el, Z.: The Chemostat – an efficient technique for medium optimization. Proc. Biochem. 16 (1981), S. 2-8; Fiechter, A.: Physical und chemical parameters of microbial growth. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 30 (1984), S. 7-60; Reiling, H. E., Laurila, H. und Fiechter, A.: Mass culture of *Escherichia coli*: medium development for low and high density cultivation of *Escherichia coli* B/r in minimal and complex media. J. Biotechnol. 2 (1985), S. 191-206) verwendet eine Puls-Einspritz-Technik, um Wachstumsreaktionen auf Nährstoffe zu erzielen. Damit können essentielle Nährstoffe identifiziert werden, deren Ausbeutekoeffizienten anschließend in einer Reihe chemostatischer Experimente, bei denen jeweils ein essentieller Nährstoff limitierend ist, bestimmt werden können. Mit den Ausbeutekoeffizienten kann dann ein optimiertes ausgewogenes Medium ermittelt werden. Da jedoch die essentiellen Nährstoffe erst einmal identifiziert werden müssen, ist auch hier der experimentelle Aufwand nicht unerheblich.

Die bekannten Optimierungsmethoden sind nicht befriedigend. Ziel der Erfindung war daher die Bereitstellung eines Verfahrens zur optimierten Durchführung von Bioprozessen, bei denen komplexe Nährstoffe eingesetzt werden, wobei der Anteil komplexer Nährstoffe im Medium während des Prozesses ständig neu dem aktuellen Bedarf der Mikroorganismen und an aktuelle Qualität der Rohstoffe angepaßt wird.

- 4 -

Erfindungsgemäss wurde gefunden, dass Bioprozesse, in denen komplexe Nährstoffgemische eingesetzt werden, dadurch optimiert werden können, dass periodisch abwechselnd die Zufuhr jeweils eines der Nährstoffe gestoppt wird, bis sich die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen um einen vorgegebenen Prozentsatz

5 vermindert. Die dabei jeweils verstrichene Zeit wird als Antwortsignal verwendet, mit dem mittels einer Optimierungsroutine neue Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe berechnet und eingestellt werden. Die Wartezeit zwischen diesen Negativ-Pulsen sollte je nach Dynamik des Prozesses zwischen $\frac{1}{4}$ und 1 hydrodynamischen Verweilzeit betragen. Sie kann jedoch ggf. ganz entfallen oder sogar länger als 5 hydrodynamischen Verweilzeit

10 betragen. Die hydrodynamische Verweilzeit ist das Verhältnis von Durchflussrate [Liter pro Stunde] zu Reaktionsvolumen [Liter].

Bei kontinuierlichem Betrieb eines ideal durchmischten Rührkessels (wie es die verwendeten Bioreaktoren sind) wird theoretische nie ein vollständiger Volumen-

15 austausch im Reaktor erreicht. Nahrungsweise betrachtet man jedoch in der chemischen Reaktionstechnik einen kontinuierlichen Rührkesselreaktor nach 3 hydrodynamischen Verweilzeiten als quasi-stationär, da dann rechnerisch 95 % des Volumens ausgetauscht sind. In der Bioverfahrenstechnik beträgt diese Zeit jedoch mindestens 5 hydrodynamische Verweilzeiten, da die Mikroorganismen während des Volumenaustausches auf die

20 veränderte Umgebung reagieren und dadurch ein quasi-stationärer Zustand erst später erreicht wird. Die Tatsache, dass bei der erfindungsgemässen Optimierungsroutine nicht nach jedem Negativ-Puls ein quasi-stationären Zustand abgewartet werden muß ist daher ein entscheidender Vorteil gegenüber herkömmlichen Puls-Antwort-Verfahren.

Das erfindungsgemässe Verfahren besitzt gegenüber Verfahren, die auf einer Positiv-Puls-Antwort beruhen, bei der sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen vorübergehend durch einen Nährstoff-Puls erhöht, auch den Vorteil, daß die gemessenen Antwortzeiten durch Lag-Phasen der Mikroorganismen nicht verfälscht werden. Eine Lag-Phase ist die Zeit, die Mikroorganismen benötigen um sich veränderten

30 Umgebungsbedingungen anzupassen. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass das mikrobielle Wachstum zunächst nahezu unverändert bleibt. Bei positiven Nährstoff-Pulsen wird dadurch die messbare Reaktion auf den gepulsten Nährstoff auf, in der Regel, nicht reproduzierbare Weise verzögert und damit die Antwortzeit verfälscht.

35 Die Stoffwechselaktivität kann über während des Prozesses beobachtbare Parameter, wie z. B. der Sauerstofftransfer-Rate oder der Kohlendioxidtransfer-Rate, gemessen werden. Unter Kohlendioxidtransfer-Rate wird hier die Menge Kohlendioxid verstanden, die pro Zeiteinheit von der flüssigen Phase (Fermentationsbrühe) in die Gasphase (Abgas)

- 5 -

übergeht. Sie kann mit der Abgasanalytik direkt gemessen werden. Da die durch die Abgasanalytik nicht erfassbare Menge Kohlendioxid, die den Reaktor in gelöster Form verlässt, in der Regel vernachlässigbar ist, kann die Kohlendioxid-bildungsrate mit der gemessenen Kohlendioxidtransfer-Rate für den erfindungsgemässen Zweck gleichgesetzt werden. Weitere Parameter, die zur Prozesssteuerung herangezogen werden können, sind z.B. pH-Wert, Konzentration an gelöstem Sauerstoff und Temperatur. Der Prozentsatz, um den die Stoffwechselaktivität gemessen an der Veränderung solcher Prozess-Parameter zurückgeht, sollte vorzugsweise relativ klein gewählt werden (ca. 1 - 5 %), damit der Prozeß nicht in Bereiche geführt wird, in denen das Substrat nicht mehr vollständig umgesetzt wird.

Bei der technischen Realisierung des erfindungsgemässen Optimierungsverfahrens werden vorzugsweise das Verhältnis der Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe und die Gesamtmenge der komplexen Nährstoffe als getrennte Regelgrößen betrachtet, die jedoch simultan geregelt werden.

15

Die simultane Regelung von Mengenverhältnis und Gesamtmenge kann erfindungsgemäss mit einer Optimierungsroutine, die als Kern vorzugsweise einen Mehrkomponentenregler besitzt, erfolgen, wie nachstehend schematisch in Figur 1 dargestellt. Der Mehrkomponentenregler kann beispielsweise auf Fuzzy-Logic (vgl. Zadeh, L. A.: Fuzzy Sets. Inf. Control 8 (1965), S. 338-353) basieren. Die Optimierungsroutine besteht vorzugsweise aus folgenden drei Ebenen:

20

1. Der Koordinationsregler zur Generierung der Regelgrößen
2. Mehrkomponentenregler (z.B. Fuzzy-Logic-Regler)
- 25 3. Steuerung der Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe

Unter Optimierungsroutine wird eine Anordnung von Elementen verstanden, deren Zusammenwirken eine Steuerung des Prozesses im gewünschten Sinn ermöglicht. Eine erfindungsgemässe Optimierungsroutine ist in Figur 1 dargestellt:

- 6 -

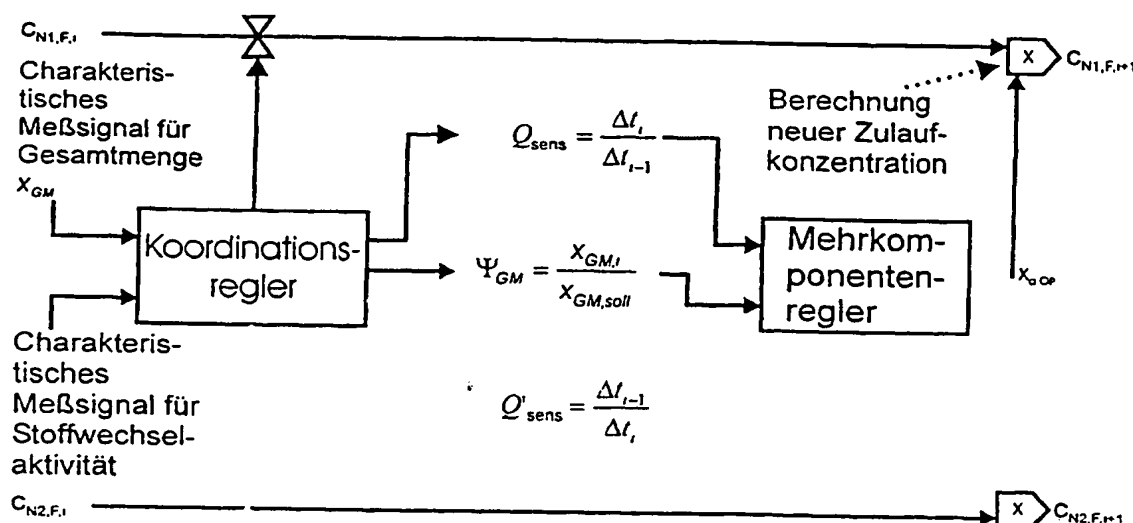


Fig. 1 : Fließschema der Optimierungsroutine; der Koordinationsregler generiert mit der Negativ-Puls-Antwort-Technik Antwortzeiten und bildet daraus die Eingangsgröße Q_{sens} . Dabei wird immer abwechselnd bei einem Nährstoff die Pulsantwortzeit gemessen während der andere pausiert. Für den pausierenden Nährstoff wird der Kehrwert Q'_{sens} als Eingangsgröße verwendet. Der Koordinationsregler berechnet außerdem die auf den Sollwert bezogene Eingangsgröße zur Regelung der Gesamtmenge Ψ_{GM} . Der Mehrkomponentenregler wird für beide Nährstoffe ($C_{N1,F,i}$ und $C_{N2,F,i}$ = Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe; dabei bezeichnen die Indizes N1 und N2 die verschiedenen komplexen Nährstoffe, F bedeutet, dass es sich um die Zulaufkonzentration handelt, und i stellt einen laufenden Index innerhalb der Optimierungsroutine dar) je einmal durchlaufen. Mit den Reglerausgängen werden anschließend die jeweiligen Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe neu berechnet.

Regelgröße für die Optimierung des Mengenverhältnisses

Die negativen Pulse werden abwechselnd bei jeweils einem komplexen Nährstoff durchgeführt während der andere pausiert (siehe Figur 2). Als Regelgröße dient in diesem Fall die (als Transfer-Rate gemessene) CO_2 - Bildungsrate.

- 7 -

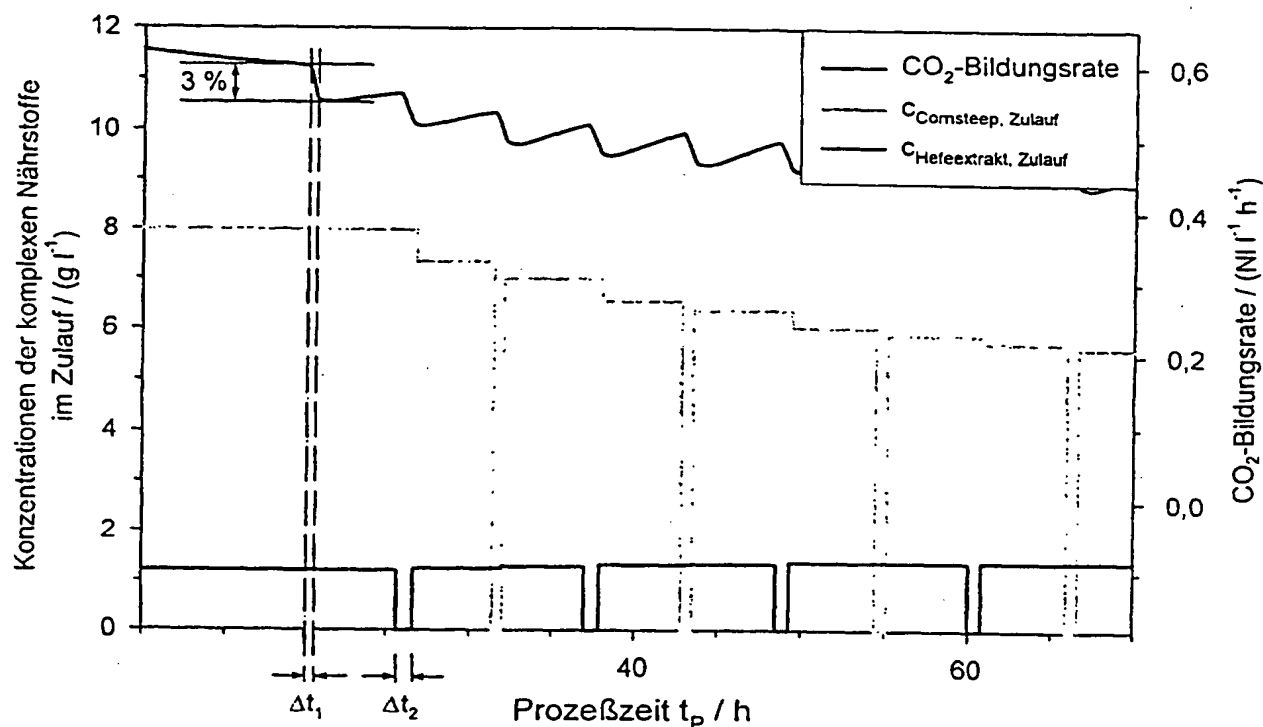


Fig. 2 :Funktionsweise der Optimierung des Mengenverhältnisses zweier komplexer Nährstoffe; nach Stoppen der Zufütterung eines komplexen Nährstoffes wird in diesem Beispiel die Zeit gemessen, bis die Kohlendioxid-Bildungsrate um 3 % abnimmt.

- 5 Anschließend berechnet der Optimierungsalgorithmus neue Zulauf-Konzentrationen beider komplexer Nährstoffe. Nach einer festzulegenden Wartezeit (in diesem Beispiel 5 h entsprechend einer halben Verweilzeit) wird ein negativer Puls bei dem anderen komplexen Nährstoff durchgeführt. Da es sich bei diesem Verfahren um ein Konvergenzverfahren handelt, ist es nicht notwendig nach jedem negativen Puls einen stationären
- 10 Zustand zu erreichen.

Die für die Optimierung des Mengenverhältnisses relevante Regelgröße

$$Q_{sens} = \frac{\Delta t_i}{\Delta t_{i-1}} \quad (1)$$

- 15 ergibt sich daher durch Quotientenbildung der aktuellen Puls-Antwortzeit Δt_i und der Puls-Antwortzeit Δt_{i-1} des vorhergehenden Zyklus, die beim jeweils anderen komplexen Nährstoff gemessen wurde. Beim pausierenden Nährstoff wird der Kehrwert von Q_{sens}

- 8 -

$$Q_{sens} = \frac{\Delta t_{i-1}}{\Delta t_i} \quad (2)$$

verwendet. Es kann daher im Anschluß der gleiche Fuzzy-Logic-Regler verwendet werden, wodurch der Aufwand für die Konfiguration des Reglers deutlich verringert werden konnte. Aufgrund des hydrodynamischen Verhaltens des Rührkesselreaktors können die
5 Antwortzeiten und damit auch der Nenner in (1) und (2) nicht gegen null gehen.

Regelgröße für die Gesamtmenge

Für die Regelung der Gesamtmenge wird als Regelgröße der Wert eines zur Prozeß-
laufzeit beobachtbaren Parameters x_{GM} , der mit der Biomasse bzw. mit der Produkt-
ausbeute korreliert, wie beispielsweise der Sauerstoff-Verbrauchsrate oder der virtuellen
10 Kohlendioxid-Konzentration, gewählt. Für den Eingang des Fuzzy-Logic-Reglers wird die
Regelgröße auf den Sollwert normiert. Man erhält als Eingangsgröße allgemein

$$\psi_{GM} = \frac{x_{GM}}{x_{GM,soll}} = \frac{\text{Regelgröße}}{\text{Sollwert}} \quad (3)$$

Erweiterbarkeit auf mehr als zwei komplexe Nährstoffe

Bei zwei zu optimierenden komplexen Nährstoffen besteht ein Schleifendurchlauf
15 aus zwei verschiedenen Schritten (Fig. 1). Prinzipiell kann jedoch die Schleife auf beliebig
viel Schritte, d.h. komplexe Nährstoffe, erweitert werden. Für den verallgemeinerten Fall
von n komplexen Nährstoffen kann

$$Q_{sens,i} = \frac{(n-1) \cdot \Delta t_i}{\sum_{q=i-n}^{i-1} \Delta t_q} \quad (4)$$

formuliert werden. Für den Parameter zur Regelung der Gesamtmenge ψ_{GM} ändert sich
20 dabei nichts. Aufgrund der hohen Zeitkonstanten sind mehr als 3 bis 4 zu optimierende
Nährstoffe nicht sinnvoll.

Steuerung der Zulauf-Konzentrationen

Entsprechend des Reglerausganges x_a des Mehrkomponentenreglers werden die Zulauf-
Konzentrationen der komplexen Nährstoffe

$$25 \quad c_{k,F,i+1} = x_a \cdot c_{k,F,i}, \quad k = N1, N2 \quad (5)$$

- 9 -

gesteuert (siehe auch Fig. 1).

In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur optimierten Umwandlung von D-Sorbit in L-Sorbose mittels Mikroorganismen der Species *Gluconobacter suboxydans*.

5

Die Erfindung wird nachstehend anhand des Beispiels der Umwandlung von D-Sorbit in L-Sorbose mittels *Gluconobacter suboxydans* weiter erläutert:

Beispiel

10

Kontinuierliche Kultivierung von *Gluconobacter suboxydans*, wobei D-Sorbit zu L-Sorbose umgesetzt wurde.

Zur Durchführung kontinuierlicher Kultivierungen von *Gluconobacter suboxydans* und zur Realisierung des angestrebten Optimierungsverfahrens mußte die

15 Fermentationsanlage folgende Anforderungen erfüllen:

1. Für kontinuierlichen Betrieb ausgerüsteter Bioreaktor
2. Auftrennung des Mediumzulaufes in mehrere Ströme der einzelnen Mediumskomponenten, damit die Zusammensetzung des Mediums zur Prozeßlaufzeit verändern werden kann
- 20 3. Messung und Regelung von für pH, pO₂ und Temperatur
4. Einrichtung zur Messung und Regelung der Füllmenge des Bioreaktors, um einen einwandfreien kontinuierlichen Betrieb gewährleisten zu können
5. Regelung des Zuluftstromes und Messung der Abgaszusammensetzung, damit entsprechende Gastransferraten als Meßsignale zur Verfügung stehen
- 25 6. Bioprozeß-Automatisierungssystem zur Steuerung der Anlage

Für die Fermentation wurde ein Standard-Labor-Bioreaktor jeweils mit entsprechender zusätzlicher Ausrüstung und einem Automatisierungssystem ausgestattet (Figur 3).

- 10 -

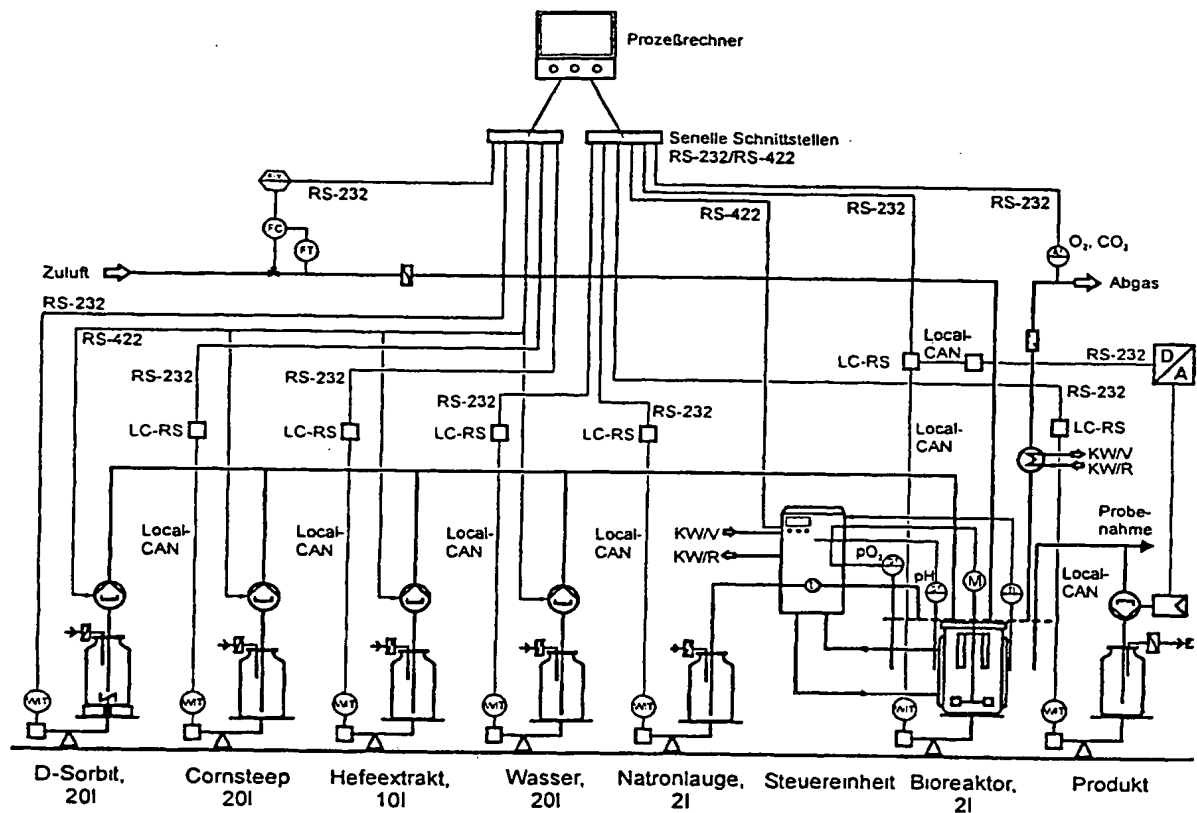


Fig. 3 : Automatisierte Laboranlage; in der unteren Reihe sind links die vier Vorratsflaschen sowie die Flasche für die Natronlauge zu sehen. Rechts davon befinden sich die Steuerungseinheit des Bioreaktors, der Bioreaktor samt Meßsonden und der Produktbehälter. Unter dem Prozeßrechner und den seriellen Schnittstellen sind die Leitungen für die Begasung mit Massenflußregler und Sterilfilter sowie für das Abgas mit CO₂- und O₂-Analytik abgebildet. Die dünnen Linien stellen die elektrischen Leitungen für die Datenübertragungen dar, die mit der entsprechenden Übertragungsart (RS-232, RS-422 bzw. Mettler Local-CAN) gekennzeichnet sind.

Als Prozeßrechner wurde ein handelsüblicher Server-PC eingesetzt. Für den Prozeßrechner wurde folgende Ausstattung gewählt:

Server-PC 'Dell PowerEdge 2200'

2 Intel Pentium II 300 MHz CPUs

128 MB Hauptspeicher 2 Graphikkarten sowie 2 Bildschirme (21")

2 Control RocketPort 16 ISA Multiport-Serielle-Karten für insgesamt 32 serielle Schnittstellen, jeweils umschaltbar zwischen RS-232 und RS-422

Verwendete Software

Das Betriebssystem des Prozeßrechners war Microsoft Windows NT 4.0 (Service Pack 3).

Als Basis diente die industrielle Automatisierungssoftware BridgeVIEW, Version 1.1,
5 von National Instruments.

Für die Anwendung von Fuzzy-Logic wurde die BridgeVIEW-Erweiterung DataEngine VI 1.5 der Firma MIT-GmbH, Aachen, verwendet.

Bioreaktor

Als Bioreaktor wurde ein Standard-Rührkesselreaktor Biostat B mit 2 l
10 Arbeitsvolumen von B. Braun Biotech International verwendet. Die Zuluft wurde in einem Silikonschlauch durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) in den Bioreaktor geleitet. Als Begasungsorgan diente der mitgelieferte Begasungsring, der unterhalb des 6-Blatt-Scheibenrührers angebracht war. Das Abgas wurde zunächst durch einen am Bioreaktor angebrachten Kühler geführt und anschließend über einen Silikonschlauch und einen
15 Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) zu den Abgasanalysatoren geleitet. Die Bioreaktoren waren je mit einer pH-Elektrode und einer pO₂-Sonde (beides von Ingold) sowie einer Temperatursonde (PT100) ausgerüstet. Bereits ab Werk waren die Bioreaktoren mit einer Steuerungseinheit ausgestattet, die Meßverstärker für pH-, pO₂- und Temperatursonden sowie die eingangs geforderten Standardregler für diese Parameter enthielten. Die
20 Übertragung der Prozeßdaten und Sollwerte der Regler vom bzw. zum Prozeßrechner erfolgte über eine serielle RS-422 Schnittstelle. Jeweils vor dem Sterilisieren wurde die Kalibrierung der pH-Elektrode (Zweipunkt-Kalibrierung bei pH = 7,00 und pH = 4,01) durchgeführt. Die Kalibrierung der pO₂-Sonde erfolgte jeweils nach dem Sterilisieren (Einpunkt-Kalibrierung auf 100 % Luftsättigung im Medium).

25 Füllmengenregelung des Bioreaktors

Die Füllmengenregelungen der Bioreaktoren wurden durch Gewichtsregelungen realisiert. Unterhalb der Reaktoren befanden sich eine Waage (Mettler Toledo SG3200I), deren digitales Signal (serielle RS-232 Schnittstelle) in einem Digital/Analog-Konverter in ein 4-20 mA Signal gewandelt wurde. Das analoge Signal war mit dem Eingang eines
30 Hardware-Reglers (Eurotherm) verbunden, der mit einem analogen 0-10 V Signal die Abförderpumpe (Gilson Minipuls 3 Peristaltikpumpe) des Bioreaktors ansteuerte.

- 12 -

Vorratslösungen

Zur Komposition des Mediums wurden fünf verschiedene Vorratslösungen verwendet (siehe auch Fig. 6), die jeweils getrennt zudosiert wurden.

- 5 Die Massenflußmessung erfolgte gravimetrisch. Die Waagensignale wurden über serielle RS-232 Schnittstellen zum Prozeßrechner übertragen. Die verschiedenen verwendeten Waagen sind in Error! Reference source not found. aufgeführt. Für die Waagen der Typen SG und PG wurden LC-RS-Adapter von Mettler-Toledo verwendet.

- 10 Die D-Sorbit-Vorratsflasche wurde zur Verhinderung der Bildung von Dichtegradienten durch einen Magnetrührer (Hersteller: Variomag), der sich zwischen Waage und Flasche befand, gerührt.

- 15 Die Medien wurden mit Peristaltikpumpen (Gilson MiniPuls 3) durch Silikonschläuche zum Bioreaktor gefördert. Die Peristaltikpumpen wurden über einen seriellen RS-422-Bus, an den bis zu 10 Pumpen angeschlossen werden können, angesteuert. Da die Pumpen nur über eine sogenannte GSIOC-Schnittstelle verfügten, wurde an jedem RS-422-Bus ein entsprechender Adapter verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Waagen

Nr.	Inhalt	Waagentyp	Maximallast	Genauigkeit
1	D-Sorbit	Mettler-Toledo KCC 150s mit ID 5	150 kg	1 g
2	Cornsteep	Mettler-Toledo SG32001 DR	32 kg	0,1 g
3	Hefeextrakt	Mettler-Toledo SG32001 DR	32 kg	0,1 g
4	Wasser	Mettler-Toledo SG32001 DR	32 kg	0,1 g
5	Natronlauge	Mettler-Toledo PG8002	8 kg	0,01 g

Zuluftregelung

- 20 Die Zuluftströme wurden mit Gas-Massenflußreglern des Typs 1179 von MKS, München, die nach dem Prinzip des Hitzdrahtanemometers arbeiteten, geregelt. Die Stromversorgung und die analoge Steuerung und Auswertung der Gas-Massenflußregler erfolgte mit einem 4-Kanal-Steuergerät des Typs 647B der Firma MKS, das über RS-232 mit dem Prozeßrechner verbunden war. Da das Meßprinzip der Regler auf der

- 13 -

- Wärmekapazität des zu messenden Gases beruhte, konnten entsprechende Gaskorrekturfaktoren eingegeben werden. Die Angabe des Gas-Massenflusses erfolgte in Normvolumen pro Zeit ($\text{Ncm}^3 \text{ min}^{-1}$, Normbedingungen, $T = 273,14 \text{ K}$; $p = 0,101325 \text{ MPa}$). Der Meßbereich betrug $2000 \text{ Ncm}^3 \text{ min}^{-1}$ bei einer Genauigkeit von 1,0% vom Endbereich. Die
- 5 Gas-Massenflußmessung war werksseitig für Stickstoff kalibriert worden. Für Luft beträgt der Gaskorrekturfaktor 1,0.

Abgasanalysatoren

- Die Abgasanalytik bestand aus einem Mikroprozessor-gesteuerten Sauerstoffanalysator OXOR 610 und einem Mikroprozessor-gesteuerten NDIR-Gasanalysator zur
- 10 Messung von Kohlendioxid UNOR 610 der Firma Maihak, Hamburg. Beide Geräte waren über RS-232 mit dem Prozeßrechner verbunden.

Sterilisierung

- Der Bioreaktor, sämtliche Zu- und Ableitungen, sowie die Produktgefäße wurden 20 Minuten lang in Sattdampfatmosfera (0.2 MPa und 121°C) sterilisiert. Zum
- 15 Anschließen der sterilen Vorratslösungen und der Zuluft- und Abgasleitungen wurden Sterilkupplungen aus Edelstahl verwendet.

Mikroorganismus

Es wurde der Mikroorganismus *Gluconobacter suboxydans*, IFO 3291 verwendet

20 Medien

- Das kontinuierliche Medium setzte sich aus vier getrennten Vorratslösungen zusammen. Um eine einfache Bestimmung der Biotrockenmasse zu ermöglichen, mußten sämtliche Lösungen frei von Feststoffen sein. Da das Cornsteep Pulver einen hohen Anteil an unlöslichen Bestandteilen hat, wurden die Cornsteep-Lösungen entsprechend
- 25 aufbereitet (siehe unten). Die Konzentrationen des resultierenden Mediums sind in g l^{-1} angegeben. Bei den einzelnen Vorratslösungen, aus denen das resultierende Medium zusammengesetzt wurde, wurde jedoch in Gewichtsprozent gearbeitet, um deren Herstellung, die durch Einwiegen der einzelnen Bestandteile erfolgte, zu vereinfachen. Folgende Lösungen wurden verwendet:

- 30 1. D-Sorbit-Lösung, 50,4 % D-Sorbit, $\rho = 1,22 \text{ kg l}^{-1}$; Ansatzgröße: 20 l

2. Cornsteep-Lösung; 2,0 % Cornsteep Pulver (Roquette, Frankreich) und Salze nach Error! Reference source not found. in entmineralisiertem Wasser; Ansatzgröße: 20 l. Vor dem Sterilisieren wurde die Lösung 10 min lang bei 4000 g zentrifugiert. Die sterilisierte Lösung wurde mit einem 3 µm Tiefenfiltermodul (Sartorius 5521307P900A, steril) vor einem 0.2 µm Membranfiltermodul (Gelman Supor DCF CFS92DS, steril) in eine leere, sterile 20 l Flasche filtriert; $\rho = 1,01 \text{ kg l}^{-1}$
3. Hefeextrakt-Lösung; 4 % Hefeextrakt-Pulver, Oxoid, und Salze nach Error! Reference source not found. in entmineralisiertem Wasser; $\rho = 1,01 \text{ kg l}^{-1}$; Ansatzgröße: 10 l
4. Wasser; Salze nach Tabelle 1 in entmineralisiertem Wasser; $\rho = 1,00 \text{ kg l}^{-1}$; Ansatzgröße: 20 l
5. 3 normale Natronlauge zur pH-Regelung; $\rho = 1,25 \text{ kg l}^{-1}$; Ansatzgröße: 2 l

Da der verwendete Mikroorganismus stets geringe Mengen saurer Metaboliten produziert, wurde zur pH-Regelung keine Säure benötigt. Die Konzentrationen der Lösungen der komplexen Nährstoffe beziehen sich auf die Trockeneinwaage des entsprechenden Pulvers. Für die Cornsteep-Lösung bedeutet das, daß auch die abgetrennten Feststoffe in der Konzentrationsangabe enthalten sind. Da Feststoffe jedoch in der Regel nicht bioverfügbar sind, ist die Vergleichbarkeit mit feststoffbeladener Cornsteep-Lösung, wie sie im Pilot- bzw. Produktionsmaßstab eingesetzt wird, gegeben.

Tabelle 1 : Salzkonzentrationen in den Vorratslösungen 2 bis 4 und im resultierenden Medium.

Salz	Salzkonzentration in Vorratslösungen 2 bis 4 bei $c_{\text{sit},F} = 275 \text{ g/l}$ / %	Salzkonzentration in Vorratslösungen 2 bis 4 bei $c_{\text{sit},F} = 137,5 \text{ g/l}$ / %	Salzkonzentration in resultierenden Medium / (g l^{-1})
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,029	0,021	0,176
KH_2PO_4	0,055	0,039	0,330
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,014	0,010	0,083

Die Salzkonzentration im resultierenden Medium sollte der eines synthetischen Wassers entsprechen. Die Salzkonzentrationen der Lösungen 2 bis 4 sowie des aus den vier ersten Lösungen resultierenden Mediums können Error! Reference source not found. entnommen werden. Da die D-Sorbit-Lösung (Lösung 1) keine Salze enthielt, mußten die Salzkonzentrationen der Lösungen 2 bis 4 entsprechend höher sein. Der Verbrauch von Lösung 5 war vernachlässigbar und wurde bei der Berechnung der Salzkonzentrationen nicht berücksichtigt.

Sämtliche Lösungen wurden 20 Minuten lang in Sattedampf-atmosphäre (0.2 MPa und 121 °C) sterilisiert.

- 5 Es wurde eine konstante Verdünnungsrate von $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und eine konstante D-Sorbit-Konzentration im Zulauf von $c_{\text{sit},F} = 275 \text{ g l}^{-1}$ gewählt. Die Zulauf-Konzentrationen von Cornsteep und Hefeextrakt wurden durch das Optimierungsverfahren vorgegeben. Aus den vorgegebenen Konzentrationen und der Verdünnungsrate berechnete jeweils das Bioprozeß-Automatisierungssystem die einzustellenden Massenflüsse für jede der
- 10 Vorratslösungen. Die berechneten Massenflüsse wurden in das Bioprozeß-Automatisierungssystem integrierte Regler umgesetzt und konstant gehalten. Die Taktzeit betrug 1 Sekunde. Dadurch wurde sicher gestellt, dass die durch die Optimierungsroutine generierten Negativ-Pulse und neu berechneten Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe exakt eingehalten wurden.

- 15 Realisierung der Optimierungsroutine für dieses spezielle Beispiel

Als charakteristisches Meßsignal für die Stoffwechselaktivität wurde die Kohlendioxid-Produktionsrate CPR gewählt.

Als charakteristisches Meßsignal für die Gesamtmenge wurde die virtuelle Kohlendioxid-Konzentration (D-Sorbit-Äquivalente pro Volumen)

20

$$c_{\text{CO}_2, \text{virt}} = \frac{\text{CPR} \cdot M_{\text{Sorbit}}}{6 \cdot 22.4 \text{ l mol}^{-1} \cdot D} \quad (6)$$

- verwendet. Da die Verdünnungsrate D generell konstant war, sind die Verläufe der Kohlendioxid-Produktionsrate CPR und der virtuellen Kohlendioxid-Konzentration $c_{\text{CO}_2, \text{virt}}$ linear abhängig. In den folgenden Abbildungen (Figur 7 bis 9) wurde daher auf die Darstellung der Kohlendioxid-Produktionsrate, die ebenfalls ein Eingang des
- 25 Koordinationsreglers ist (siehe Figur 2), verzichtet.

Für den speziellen Fall dieses Beispiels berechnet sich daher die Regelgröße für die Gesamtmenge

$$\psi_{\text{GM}} = \frac{c_{\text{CO}_2, \text{virt}}}{c_{\text{CO}_2, \text{virt}, \text{soll}}} \quad (7)$$

- 16 -

aus der aktuellen virtuellen Kohlendioxid-Konzentration und dem festzulegenden Sollwert für die virtuelle Kohlendioxid-Konzentration.

Für dieses spezielle Beispiel wurde der Mehrkomponentenregler in Form eines Fuzzy-Logic-Reglers realisiert.

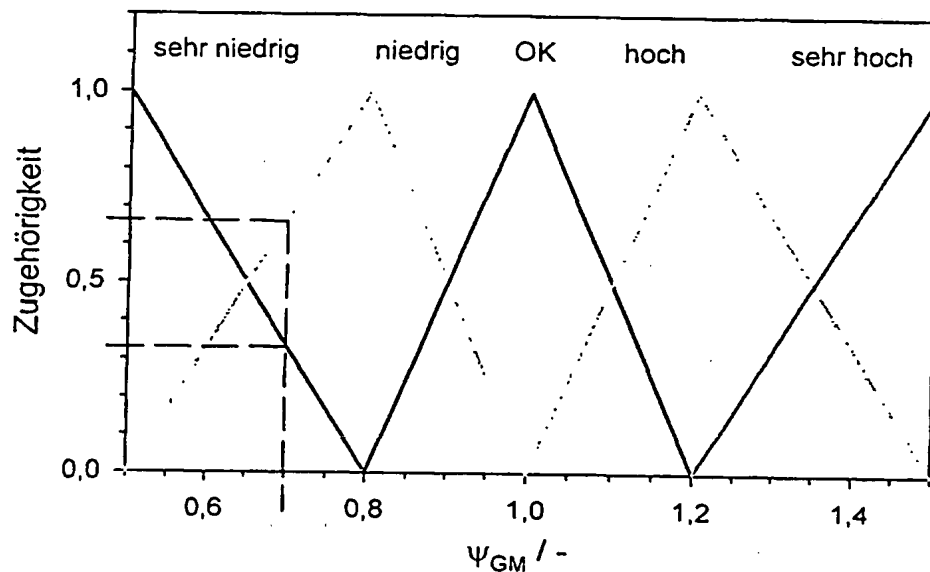


Fig. 4 : Fuzzy Zugehörigkeitsfunktionen; in diesem Beispiel wird der numerische Wert 0,7 der Funktion 'sehr niedrig' mit einer Zugehörigkeit von 0,33 und der Funktion 'niedrig' mit einer Zugehörigkeit von 0,67 zugeordnet. Das heißt der numerische Wert $\Psi_{GM} = 0,7$ bedeutet im linguistischen Sinne 33 % 'sehr niedrig' und 67 % 'niedrig'.

Die numerischen Werte der Regelgrößen Q_{sens} und Ψ_{GM} bzw. Q'_{sens} und Ψ_{GM} werden in linguistische Variablen der Fuzzy-Logic, die sogenannte Zugehörigkeitsfunktionen enthalten, übersetzt (Fig. 4). Dieser Vorgang wird auch als 'Fuzzyfizierung' bezeichnet. Da für den komplexen Nährstoff, dessen Pulsantwortzeit im aktuellen Zyklus gemessen wurde, und den pausierenden komplexen Nährstoff der selbe Fuzzy-Logic-Regler nur mit unterschiedlichen Regelgrößen verwendet wird, wird im folgenden nicht weiter zwischen Q_{sens} und Q'_{sens} unterschieden. Durch 'wenn ... dann' Regeln werden die linguistischen Eingangsvariablen Q_{sens} und Ψ_{GM} verknüpft und der linguistischen Ausgangsvariablen zugeordnet. Da die Zuordnung zu den Zugehörigkeitsfunktionen nicht scharf ist (siehe Fig. 3), können mehrere Regeln gleichzeitig zutreffen.

- 17 -

Die Gewichtung der Regeln erfolgt anhand der Zugehörigkeitswerte. Die linguistische Ausgangsvariable wird in einen numerischen Wert zurücktransformiert, der den Reglerausgang x_a darstellt. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als 'Defuzzifizierung'.

5

Nähere Informationen über Fuzzy-Logik können der einschlägigen Literatur entnommen werden (Zimmermann, H.-J. (Hrsg.): Fuzzy-Technologien - Prinzipien, Werkzeuge, Potentiale. Düsseldorf: VDI-Verlag 1993).

Durchgeführte Fermentationsläufe unter Anwendung der Optimierungsroutine

- 10 Der eingeregelter Prozeß wurde über einen Zeitraum von 13 Tagen beobachtet (siehe Fig. 5). Die Regelgröße $c_{CO_2, virt}$ und beide Stellgrößen schwingen in zeitlichem Versatz von ca. einem halben Tag zueinander. Anscheinend reagierte der Fuzzy-Logic-Regler etwas zu stark auf Sollwertabweichungen der Regelgröße $c_{CO_2, virt}$. Es handelt sich jedoch nicht um anwachsende Schwingungen. Der Prozeß blieb insgesamt stabil. Die Regelgröße Q_{sens}
- 15 schwankte in unregelmäßigen Abständen um ihren Sollwert. Aber auch hier war kein instabiles Verhalten zu beobachten.

- 18 -

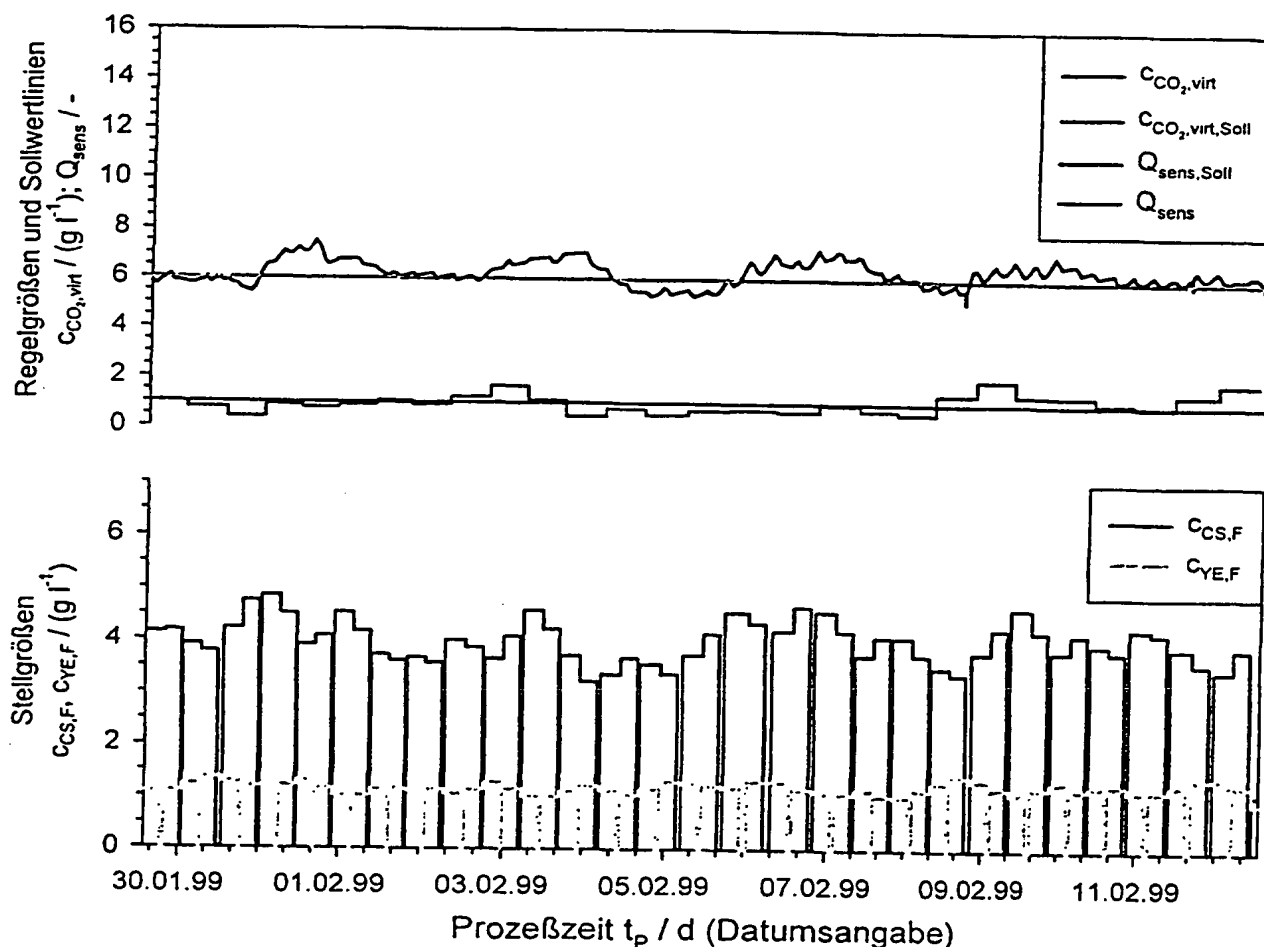


Fig. 5 : Zeitliche Verläufe der Regelgröße $c_{CO_2, virt}$ und Q_{sens} jeweils mit Sollwertlinien sowie der Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe $c_{CS, F}$ und $c_{YE, F}$ über 13 Tage (Datumsangabe). Q_{sens} ist nur für Cornsteep dargestellt. Für Hefeextrakt wäre der Verlauf von Q_{sens} genau reziprok. $Q_{sens} > 1$ bedeutet daher in diesem Fall, daß die Cornsteep-Zulauf-Konzentrationen erhöht werden muß.

Optimierung des Mengenverhältnisses

Um die Regelgröße Q_{sens} auszuregeln, wurden künstlich Qualitätsschwankungen der komplexen Nährstoffe herbeigeführt. Dazu wurden jeweils die Vorratsflaschen der komplexen Nährstoffe durch solche mit komplexen Nährstoffen anderer Hersteller und damit anderer Qualität ersetzt.

Ein besonders prägnantes Beispiel war der Wechsel von Oxoid Hefeextrakt zu Roth Hefeextrakt (Fig. 6). Das Verhältnis von Cornsteep zu Hefeextrakt änderte sich von etwa 3 : 1 auf 1 : 1. Bei einem erneuten Wechsel zurück zu Oxoid Hefeextrakt stellte sich wieder

- 19 -

das alte Verhältnis ein. Die Dauer der Einregelung betrug etwa 3 Tage bzw. 7 hydrodynamische Verweilzeiten.

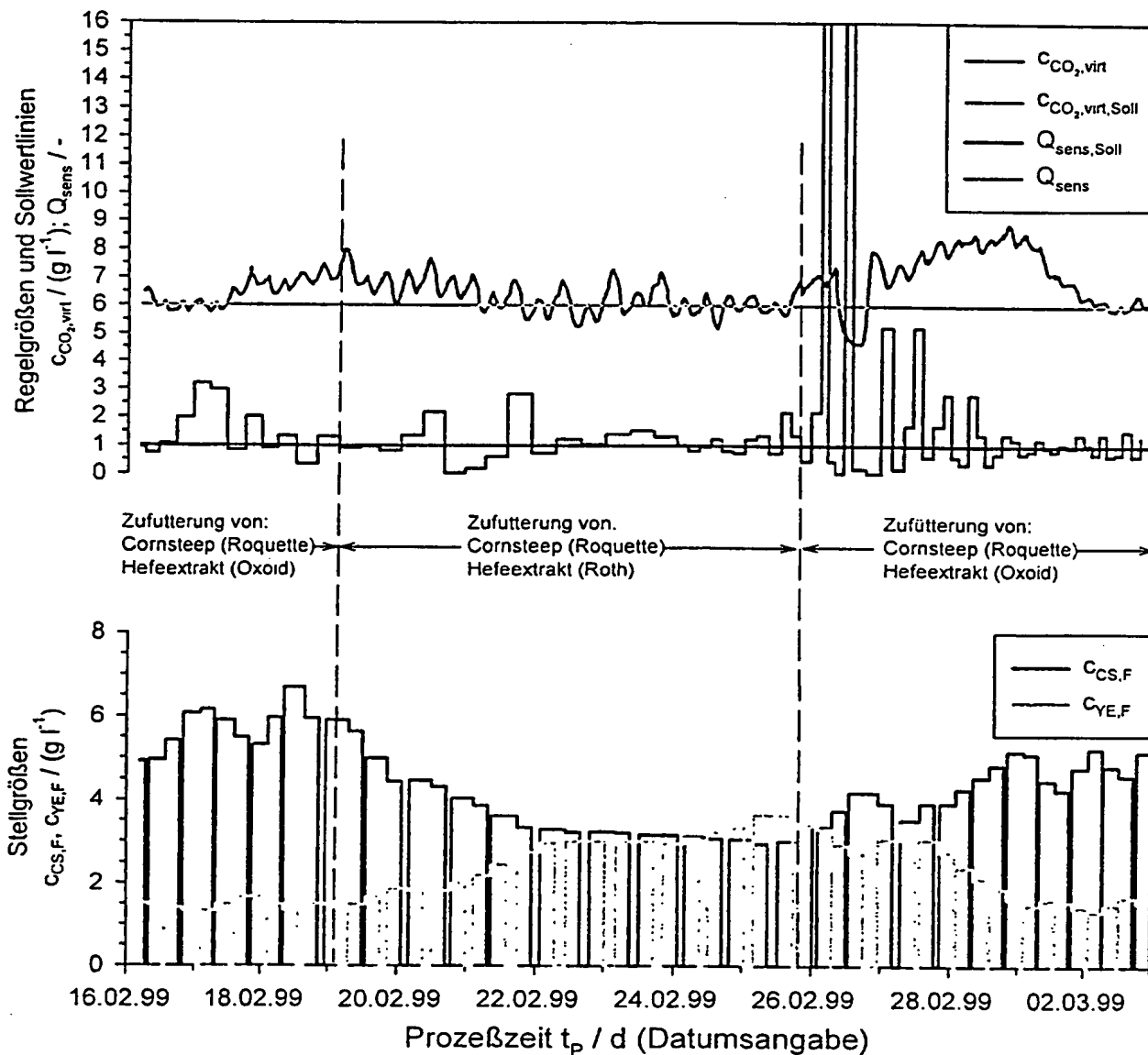


Fig. 6: Ausschnitt eines Testlaufes des Optimierungsverfahrens von 14 Tagen; Wechsel von Oxid Hefeextrakt zu Roth Hefeextrakt und wieder zurück zu Oxid Hefeextrakt; die hochfrequenten Schwingungen (ca. 4 pro Tag) bei der virtuellen Kohlendioxid-Konzentration $C_{CO_2,virt}$ entstehen durch die Puls-Technik.

In Fig. 8 ist zu sehen, daß durch den Wechsel des Hefeextraktes bedingt zum Teil erhebliche Abweichungen von den Sollwerten auftreten. Das Optimierungsverfahren vermag jedoch auch in diesen Situationen, den Prozeß stabil zu halten.

- 20 -

Einregelung der Gesamtmenge

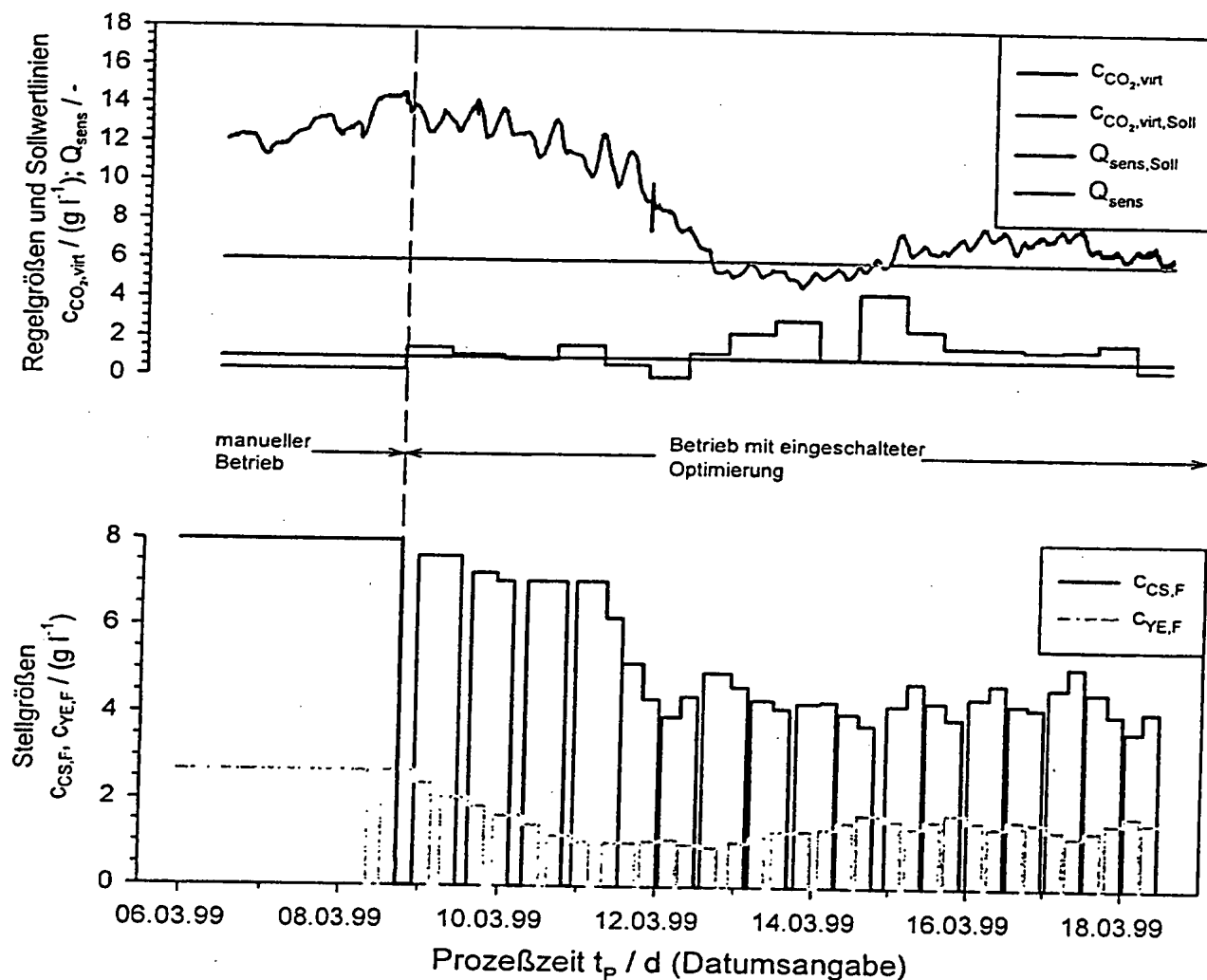


Fig. 7: Zeitliche Verläufe der virtuellen Kohlendioxid-Konzentration $C_{CO_2,virt}$ sowie der Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe $C_{CS,F}$ und $C_{YE,F}$ nach Einschalten des Optimierungsverfahrens bei ausgelenkter Regelgröße für die Gesamtmenge komplexer Nährstoffe $C_{CO_2,virt}$.

Die Einregelung der virtuellen Kohlendioxid-Konzentration $C_{CO_2,virt}$ von einem relativ hohen Ausgangswert von etwa $13\ g\ l^{-1}$ auf den Sollwert von $6\ g\ l^{-1}$ wird in Fig. 7 gezeigt. Im rechten Bereich der Fig. 7 ist deutlich ein Überschwingen zu erkennen. Die Dauer der Einregelung beträgt 4 Tage bzw. etwa 10 Verweilzeiten.

Nach bei Erreichen der Sollwerte verbesserte sich die molare Ausbeute bezüglich L-Sorbose von 90,3 % auf 91,1 %. Die Konzentrationen der komplexen Nährstoffe im Zulauf $C_{CS,F}$ und $C_{YE,F}$ konnten im Mittel um 51 % bzw. 56 % reduziert werden.

- 21 -

Patentansprüche

1. Verfahren zur optimierten Durchführung von Bioprozessen, in denen komplexe Nährstoffgemische eingesetzt werden, wobei periodisch abwechselnd die Zufuhr jeweils
5 eines der Nährstoffe gestoppt wird, bis sich die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen um einen vorgegebenen Prozentsatz vermindert, worauf mittels einer Optimierungsroutine neue Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe berechnet und eingestellt werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Optimierungsroutine einen Koordinationsregler zur Generierung der Regelgrößen, einen Mehrkomponentenregler, und eine Steuerung der Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe umfasst.
- 15 3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei zwei voneinander verschiedene komplexe Nährstoffgemische verwendet werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1-3, wobei die Optimierungsroutine dem Fließschema der Fig. 1 entspricht.
- 20 5. Verfahren nach den Ansprüchen 2-4, wobei der Mehrkomponentenregler ein Fuzzy-Logic-Regler ist.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1-5, wobei das Verhältnis der Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe und die Gesamtmenge der komplexen Nährstoffe als
25 getrennte Regelgrößen betrachtet, jedoch simultan geregelt werden.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1-6, wobei der Mikroorganismus *Gluconobacter suboxydans* ist.
- 30 8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei D-Sorbit zu L-Sorbose umgesetzt wird.
9. Vorrichtung zur optimierten Durchführung von von mikrobiologischen Prozessen, in denen komplexe Nährstoffgemische eingesetzt werden, wobei periodisch abwechselnd die Zufuhr jeweils eines der Nährstoffe gestoppt wird, bis sich die
35 Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen um einen vorgegebenen Prozentsatz vermindert, worauf mittels einer Optimierungsroutine neue Zulaufkonzentrationen der komplexen Nährstoffe berechnet und eingestellt werden, umfassend

- 22 -

- a) einen Reaktor für die Durchführung des mikrobiologischen Prozesses mit mindestens zwei individuellen Zuleitungen für die Zufuhr von Nährstoffen;
- b) Sensoren zur Messung der metabolischen Aktivität der Mikroorganismen;
- c) einen durch die Sensoren gesteuerten Koordinationsregler;
- 5 d) einen Mehrkomponentenregler; und
- e) Steuerungselemente für die Zulauf-Konzentrationen der komplexen Nährstoffe.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9, wobei die Elemente b) bis e) gemäss Fig. 1 angeordnet sind.

10

11. Die Erfindung wie sie hiervor, insbesondere in den Beispielen und Figuren, beschrieben ist.
